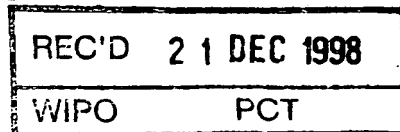


FR 98/02579



E. A. J. U

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 30 NOV. 1998

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales.

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES 27.MAR.1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

27 MARS 1998

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET BEAU DE LOMENIE
158, rue de l'Université
75340 PARIS CEDEX 07

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention☐ demande divisionnaire☐ certificat d'utilité☐ transformation d'une demande
de brevet européen

demande initiale

☐ brevet d'invention☐ certificat d'utilité n°

date

n° du pouvoir permanent H23442/8/FG références du correspondant 01.44.18.89.00. téléphone

Établissement du rapport de recherche

☐ différé☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

"Procédé perfectionné pour éviter la dégradation d'un principe actif".

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

CAPSULIS

Forme juridique

Société Anonyme

Nationalité (s)

FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

Pays

Château Bersol
218-228 Avenue du Haut-Levêque
F-33600 PESSAC

FR

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

FR**97.15073****01.12.1997****Brevet**

Priorité interne selon l'Article L 612.3 du Code de la Propriété Intellectuelle
du 01/07/92.

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Françoise GIRAUD**Conseil en Propriété Industrielle****B.I. - N° 92 4022****Cabinet BEAU DE LOMENIE**

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

7803807

TITRE DE L'INVENTION :

"Procédé perfectionné pour éviter la dégradation d'un principe
actif".

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

CAPSULIS

Société Anonyme

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- 1) **DEGERT Corinne**
49, Rue Claude Debussy
33160 St Médard en Jalles
FRANCE
- 2) **LAVERSANNE René**
62, Avenue du Parc d'Espagne
33600 PESSAC
FRANCE
- 3) **ROUX Didier**
6bis rue Langevin
33700 MERIGNAC
FRANCE
- 4) **UGAZIO Stephane**
2, passage Fronsac
33000 BORDEAUX
FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 27 Mars 1998

Françoise GIRAUD
Conseil en Propriété Industrielle
B.I. - N° 92 4022
Cabinet BEAU DE LOMENIE

La présente invention concerne un procédé perfectionné pour éviter la dégradation d'un principe actif.

5 Que ce soit en cosmétique, en pharmacie, en détergence ou encore en agroalimentaire, la fonctionnalité d'un produit est généralement due à la présence d'une molécule dite matière active ou agent actif. A titre d'exemple, on peut citer les vitamines, utilisées en agro-alimentaire et en pharmacie, les enzymes utilisées en détergence, les organo-phosphorés utilisés comme insecticides, ou encore les
10 arômes et parfums utilisés dans l'hygiène, l'agro-alimentaire ou la cosmétique.

 L'une des caractéristiques essentielles d'un produit industriel ou pharmaceutique, outre son activité et son efficacité, est sa stabilité, de manière à obtenir un produit ayant une durée de vie suffisante. Malheureusement, de nombreuses matières actives sont des molécules particulièrement fragiles, dont la
15 dégradation sous l'effet des contraintes d'environnement est trop rapide pour obtenir la durée de vie souhaitée du produit la contenant. C'est le cas de certaines vitamines comme les vitamines C, A ou E, de beaucoup d'enzymes comme par exemple les protéases, et plus généralement de beaucoup de protéines et de molécules biologiques, ou encore dans le domaine des insecticides, du malathion
20 et des pyréthrinoïdes, et, d'une manière plus générale, des molécules réductrices ou oxydantes.

 De nombreuses stratégies ont été élaborées pour éviter la dégradation de ces molécules actives fragiles. Ces stratégies dépendent de la nature de la réaction provoquant la dégradation. Les réactions les plus souvent incriminées
25 sont soit l'hydrolyse soit l'oxydo-réduction. D'autres réactions plus spécifiques ont aussi lieu, comme l'autoprotéolyse dans le cas des protéases.

 Dans le cas où l'eau est une cause directe ou indirecte de la dégradation, une solution simple consiste à éviter le contact de la molécule active avec un milieu aqueux. C'est le cas par exemple d'insecticides dissous dans un
30 solvant organique, et mis en œuvre en aérosol. Malheureusement cette possibilité n'existe pas toujours, comme par exemple pour la cosmétique ou l'agro-alimentaire, qui, pour des raisons évidentes, ne peuvent utiliser les solvants organiques. De plus, la tendance actuelle, pour des raisons écologiques et de santé publique, est à la suppression de l'utilisation de solvants organiques dans toutes les
35 branches de l'industrie.

Lorsque l'eau n'est qu'une cause indirecte, par exemple par effet d'oxydation par l'oxygène dissous, on peut travailler avec une eau dégazée. D'une manière plus générale, on peut travailler en atmosphère inerte, à la fois pour la fabrication et la conservation du produit final. Cette solution est souvent employée en agro-alimentaire, où les produits liquides enrichis en vitamines sont conditionnés soit sous vide d'air, soit sous atmosphère inerte. Malheureusement cette méthode ne permet de limiter la dégradation que jusqu'à l'ouverture du contenant. Elle n'est donc pas applicable dans le cas de produits nécessitant une longue durée de vie après ouverture.

Les enzymes sont des protéines qui catalysent de manière très spécifique des réactions chimiques. Elles sont très utilisées industriellement, par exemple dans les lessives pour dégrader les protéines (protéases), les lipides (lipases) ou les résidus amylacés (amylases), facilitant ainsi le nettoyage. Ces protéines sont en général instables en solution, et sont donc surtout utilisées dans les lessives poudre. Leur utilisation en lessive liquide (pour le linge ou la vaisselle) est très limitée par leur instabilité à long terme.

De même, une tendance actuelle est à l'utilisation d'enzymes en cosmétique, par exemple des protéases pour aider à la desquamation de la peau, et donc à son renouvellement. Là encore l'instabilité des enzymes empêche leur utilisation simple.

L'immobilisation d'enzymes est un sujet très développé, au moins en recherche, les applications industrielles n'étant pas encore très nombreuses. Les travaux sur l'encapsulation d'enzymes font partie de ceux du domaine de la bioencapsulation qui comprend aussi l'encapsulation d'organismes "vivants" (levures, bactéries...). En général il est fait appel à des polymères qui forment une matrice immobilisant l'enzyme.

Dans ces travaux, il s'agit généralement d'immobiliser l'enzyme (ou la levure) pour l'avoir sous forme facilement manipulable, comme par exemple des microbilles que l'on peut extraire du milieu de réaction, après usage, par simple filtration ou tamisage suivant leur taille. Par conséquent la forme encapsulée de l'enzyme doit garder son activité. Le matériau d'encapsulation doit être suffisamment poreux pour laisser diffuser le substrat et les produits de réaction. Une revue de ces développements peut être trouvée dans "Bioencapsulation in biotechnology, Biomat., Art. Cells & Immob. Biotech., 21, 291-297 (1993)".

Les principales réactions conduisant à la perte d'activité d'une enzyme

sont la dégradation chimique, la perte de configuration spatiale ou l'agréation de plusieurs enzymes. Les méthodes typiquement utilisées pour éviter ou limiter les excès de ces dégradations sont la modification chimique de la molécule et l'immobilisation.

5 La protection d'enzymes vis à vis de leur dénaturation par encapsulation est moins courante. En effet, les matrices polymères utilisées dans l'immobilisation laissant diffuser les substrats, elles sont trop poreuses pour réellement protéger l'enzyme. Les principales réactions de dégradation sont celles touchant les protéines. Il s'agit, en particulier, d'hydrolyses spécifiques des liaisons
10 entre acides aminés et de réactions conduisant à une dénaturation par changement de conformation n'impliquant pas de liaisons covalentes, mais entraînant une perte d'activité de l'enzyme, par modification de l'accessibilité du site catalyseur par exemple. Ainsi dans l'article "Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres, J. Microencapsulation, 14, 51-61 (1997)", il est
15 montré qu'il est nécessaire de réticuler préalablement l'enzyme par du glutaraldéhyde pour assurer sa protection, ce qui induit une perte de 50 % de son activité.

Dans le cas des enzymes, par exemple dans les lessives liquides ou dans les crèmes cosmétiques, il n'est pas possible d'utiliser un solvant non aqueux,
20 à la fois pour des raisons de sécurité et de coût. L'introduction d'enzymes dans ce type de produit se heurte donc à des difficultés réelles. Une solution, parfois adoptée en cosmétique consiste à utiliser un emballage sophistiqué, constitué de deux réservoirs indépendants, l'un contenant la molécule active, l'autre contenant le reste de la préparation. Le mélange est effectué extemporanément au moment de
25 l'utilisation du produit, grâce à un système de double pompe doseuse sur le flacon. Cette solution est assez onéreuse, et peu commode d'utilisation. Cette solution a aussi été mise en œuvre dans le cas de la cosmétique pour proposer des produits de beauté contenant des vitamines.

Une autre méthode consiste aussi à séparer l'actif de son milieu, mais
30 de manière microscopique en le microencapsulant dans des microsphères de polymère, ou en l'enrobant, par exemple par une technique d'enrobage en lit fluidisé, dans une matrice polymère. Cette technique peut s'avérer intéressante, en particulier pour des produits destinés à être incorporés dans des formes sèches. Elle présente l'inconvénient de nécessiter la rupture de la coque ou de l'enrobage
35 polymère pour libérer l'actif. Elle est donc peu adaptée à des produits cosmétiques

où la libération de l'actif doit se faire spontanément au moment de l'application du produit, ou à des produits alimentaires, qui doivent libérer leur actif en bouche.

Lorsque l'instabilité de la matière active est modérée, l'utilisation de molécules protectrices peut s'avérer intéressante. C'est le cas des agents anti-oxydants largement utilisés dans les crèmes cosmétiques et les produits alimentaires. Ils sont en général simplement additionnés à la préparation, mais du fait de la dilution il est nécessaire d'en ajouter une quantité plus importante que nécessaire pour obtenir un effet. D'autre part, comme beaucoup d'additifs, leur usage tend à être de plus en plus réglementé, et les doses autorisées diminuées.

10 La demanderesse a décrit des compositions dans lesquelles un agent actif se trouve encapsulé au sein de vésicules multilamellaires à structure en oignon, constituées, de leur centre jusqu'à leur périphérie, d'une succession de couches lamellaires séparées par un milieu liquide. Ces vésicules peuvent être obtenues par un procédé comprenant la préparation d'une phase lamellaire cristal-liquide et sa transformation par application d'un cisaillement. Un tel procédé est
15 en particulier décrit dans le brevet WO 93/19735 issu du brevet français FR 2 689 418 ou WO 95/18601 introduits ici par référence.

Selon le brevet français FR 2 689 418, cette transformation peut être faite lors d'une étape de cisaillement homogène de la pâte cristal-liquide, ce qui
20 conduit à des vésicules encore appelées micro-capsules de taille contrôlée. Toutefois, en jouant sur la formulation de la phase lamellaire cristal-liquide, en particulier sur la nature des tensioactifs entrant dans sa composition, la transformation de cette phase cristal-liquide en vésicules peut être obtenue par simple sollicitation mécanique, en particulier lors du mélange des constituants.

25 Différentes applications de ce type de vésicules ont été décrites par la demanderesse. On citera, en particulier, la demande internationale WO 95/19707 qui décrit des compositions odorantes dans lesquelles un produit odorant se trouve incorporé au sein de telles vésicules multilamellaires, l'effet d'une telle encapsulation étant d'augmenter la rémanence de l'odeur, du fait du ralentissement de l'évaporation. On citera également la demande française FR 2 735 658 qui
30 décrit des compositions à usage alimentaire dans lesquelles un produit ou un additif à usage alimentaire se trouve inclus au sein de telles vésicules multilamellaires, avec pour effet essentiel d'obtenir un relargage contrôlé particulièrement avantageux du produit encapsulé, la présence de la vésicule
35 multilamellaire permettant en outre de protéger, avant leur introduction dans les

compositions, les molécules souvent fragiles qui se trouvent incorporées en son sein.

5 Toutefois, une telle composition, même si elle apporte dans certains cas un effet déjà sensible sur la stabilisation des molécules fragiles, peut s'avérer insuffisante pour des molécules particulièrement sensibles ou dont on cherche à obtenir une stabilisation particulièrement accrue à l'égard d'un environnement a priori défavorable.

10 Ainsi les inventeurs de la présente invention ont maintenant découvert que l'action de protection de molécules fragiles déjà observée dans le cas particulier de certains produits du domaine alimentaire, pouvait être considérablement accrue par incorporation au sein des vésicules multilamellaires d'un agent destiné à stabiliser ces molécules fragiles. Une telle présentation du couple produit actif/agent stabilisant permet d'obtenir une stabilisation accrue, donc une durée de vie des produits incorporant l'agent actif accrue avec des
15 concentrations nettement plus faibles en agent stabilisant, ce qui est un avantage considérable de la présente invention.

Cette invention s'avère particulièrement intéressante dans tous les domaines où l'on cherche à protéger un agent actif vis-à-vis d'une action de dégradation. Elle s'applique à tous les produits connus pour leur fragilité et, tout
20 particulièrement, aux vitamines et aux enzymes.

En ce qui concerne les enzymes, l'invention fournit un moyen particulièrement efficace permettant d'assurer à la fois la fonction d'immobilisation d'une enzyme et sa protection vis-à-vis du milieu extérieur en vue d'améliorer sa stabilité.

25 Ainsi, la présente invention offre une solution particulièrement économique et efficace aux problèmes liés à la stabilisation de matières actives fragiles avec, en outre, tous les avantages liés à la technique d'encapsulation utilisée :

- grande souplesse de formulation,
- 30 - grande variété des tensioactifs utilisables,
- capacité de mettre en oeuvre simultanément plusieurs actifs,
- possibilité de recourir à plusieurs agents, en vue d'augmenter encore la stabilisation,
- stabilité accrue en milieu aqueux, aussi bien simple que complexe
35 (gel, détergent, émulsion).

Ainsi, selon l'une de ses caractéristiques essentielles, l'invention concerne des compositions contenant un agent actif encapsulé au sein de vésicules multilamellaires présentant une structure en oignon et constituées, de leur périphérie jusqu'à leur centre, de membranes concentriques sous forme de bicouches comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites membranes étant
 5 séparées par un liquide interstitiel, lesdites vésicules contenant au moins un agent destiné à éviter la dégradation dudit agent actif.

Par structure en "oignon", on entend, comme exposé précédemment, une structure multilamellaire, dans laquelle les vésicules de forme sensiblement
 10 sphérique sont constituées d'une succession de bicouches concentriques et, cela, du centre à la périphérie des vésicules, d'où le nom de structure en oignon utilisé par analogie, pour qualifier de telles structures.

Ces structures peuvent être mises en évidence par examen microscopique des compositions. L'observation se fait en utilisant un microscope
 15 optique en lumière polarisée, dans lequel une phase lamellaire, biréfringente est visible. Elle se manifeste par une texture caractéristique, liée à la présence des défauts (joints de grains) entre les domaines de phase orientés différemment. Dans le cas de la phase concentrée de vésicules, la texture est caractérisée par son caractère uniforme et fin, relié à la taille des vésicules. Dans la phase dispersée de
 20 vésicules, celles-ci sont visibles sous la forme de points plus ou moins résolus (en fonction de la taille), légèrement biréfringents. La biréfringence ne s'observe que lorsque la dispersion n'est pas trop diluée. Il y aura donc lieu, si la dispersion est relativement diluée de procéder à une opération préalable de concentration pour mettre clairement en évidence la biréfringence caractéristique de la présence des
 25 vésicules à structure en oignon.

Le principe de l'invention consiste à utiliser les vésicules comme des micro-réceptacles contenant la molécule à protéger, et empêchant la réaction de dégradation de se produire. Pour cela, le rôle de la vésicule est double : d'une part isoler la molécule active de son environnement, et d'autre part apporter les additifs
 30 nécessaires à la stabilisation, ce qui s'avère particulièrement intéressant pour les molécules sensibles. L'un des avantages majeurs de la vésicule est de confiner la molécule fragile et sa protection dans un petit volume, beaucoup plus faible que le volume total de la préparation, et donc d'éviter ainsi l'effet de dilution, permettant de ce fait l'utilisation d'une plus faible quantité de molécule protectrice.

Selon une variante avantageuse, le liquide interstitiel est de l'eau et l'agent actif est inclus dans les membranes des vésicules lorsqu'il est hydrophobe ou dans le liquide interstitiel lorsqu'il est hydrophile.

5 Selon une autre variante avantageuse de l'invention, les vésicules ont des dimensions comprises entre 0,1 et 50 μm , de préférence entre 0,2 et 10 μm .

De telles structures sont avantageusement obtenues par incorporation de l'agent actif et de l'agent destiné à le stabiliser dans une phase lamellaire cristal-liquide comprenant au moins un agent tensioactif puis transformation, par application d'un cisaillement, de cette phase cristal-liquide lamellaire en une phase
10 dense de vésicules multilamellaires de petite taille.

Ce cisaillement pourra être un cisaillement homogène, ce qui présente l'avantage de conduire à des vésicules de taille parfaitement homogène. Toutefois, une simple agitation mécanique pourra s'avérer suffisante pour conduire à la formation des vésicules multilamellaires de l'invention.

15 Selon le brevet français FR-2 689 418, cette transformation peut être faite lors d'une étape de cisaillement homogène de la phase cristal-liquide, ce qui conduit à des vésicules ou microcapsules de taille contrôlée. Toutefois, en jouant sur la formulation de la phase lamellaire cristal-liquide, en particulier sur la nature des tensioactifs entrant dans sa composition, la transformation de cette phase
20 cristal-liquide en vésicules peut être obtenue par simple sollicitation mécanique, en particulier lors du mélange des constituants.

Comme cela ressort en particulier des exemples illustratifs de l'invention, le choix des agents tensioactifs utilisables pour former les membranes des vésicules multilamellaires de l'invention est très large. Toutefois, on choisira
25 ces agents tensioactifs en fonction du domaine d'utilisation de la composition visée. Dans de nombreux cas, l'application envisagée comporte des contraintes qui limitent le choix des tensioactifs. Il s'agit souvent de contraintes législatives ou liées à des normes. Ainsi, dans le domaine de la cosmétique, le catalogue de l'INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) fournit la liste des
30 produits autorisés, dans le cas de l'agro-alimentaire on se réfère à la liste positive des additifs autorisés, ou dans celui de la pharmacie, à la pharmacopée.

La formulation fait avantageusement intervenir un mélange de molécules tensioactives. Il est généralement utilisé au moins deux tensioactifs différents ayant des balances hydrophile-lipophile différentes, ce qui permet de
35 régler en continu les propriétés des bicouches et ainsi de contrôler l'apparition de

l'instabilité qui gouverne la formation des vésicules multilamellaires.

Selon une variante particulièrement avantageuse de l'invention, on utilisera un mélange de deux agents tensioactifs dits respectivement agent tensioactif lipophile, présentant une balance hydrophile-lipophile (HLB) comprise
5 entre 3 et 7, et agent tensioactif hydrophile, présentant une HLB comprise entre 8 et 15.

Selon une autre variante avantageuse de l'invention, les membranes des vésicules contiennent au moins un agent tensioactif polymère ou un polymère présentant des propriétés amphiphiles.

10 C'est le cas par exemple des poloxamères, et autres dérivés copolymères de l'oxyde d'éthylène et de l'oxyde de propylène éventuellement modifiés par adjonction de chaînes hydrophobes.

On peut citer à titre d'exemples non exhaustifs la famille des Pluronic® et Lutrol® (BASF), les hydroxystéarate de polyéthylène (Solutol® de BASF ou
15 MYRJ® de ICI).

L'invention s'applique de façon particulièrement avantageuse à tout type d'agent actif connu pour sa fragilité. Il s'agit en particulier d'agents sensibles à l'oxydation ou à la réduction, à l'hydrolyse ou à des réactions plus spécifiques telles que l'autoprotéolyse dans le cas des protéases.

20 A titre d'agents actifs fragiles auxquels s'adresse tout particulièrement la présente invention, on citera les molécules réductrices, oxydantes, sensibles à l'hydrolyse, en particulier les vitamines, les enzymes, les protéines, les molécules biologiques d'une façon générale.

Un domaine où elle trouve des applications également très
25 intéressantes est celui des insecticides. En effet, les insecticides se classent en plusieurs grandes familles parmi lesquelles on peut citer les organophosphorés, les organochlorés et les pyréthrénoïdes. La tendance actuelle est d'utiliser des molécules suffisamment biodégradables pour être rapidement détruites dans l'environnement. Les organochlorés par exemple sont quasiment tous interdits à
30 cause de leur trop grande persistance dans l'environnement. Se pose alors le problème de la stabilité dans le temps des molécules utilisées. C'est le problème posé par certains organophosphorés qui sont assez rapidement hydrolysés ou les pyréthrénoïdes (dérivés synthétiques du pyrèthre, extrait d'un chrysanthème) qui sont instables. Le procédé de l'invention s'avère particulièrement intéressant pour
35 stabiliser tous ces produits particulièrement instables. C'est le cas en particulier

des pyréthrénoïdes.

Un autre domaine où l'invention trouve des applications particulièrement intéressantes est celui de la cosmétique et de la dermatologie où de nombreux actifs sont connus pour leur fragilité. C'est le cas en particulier des vitamines A, E et C, par exemple, et également des molécules comme la DHA (dihydroxyacétone, agent autobronzant), des oligomères procyanidoliques, des enzymes.

Un autre domaine où l'invention trouve une application particulièrement intéressante est celui des médicaments pour lesquels les notions de fragilité de la molécule, et de limitation des additifs autorisés sont encore plus pertinentes que dans la cosmétique.

Un autre exemple où l'invention trouve des applications intéressantes est celui de la stabilisation de l'hydroquinone et de ses dérivés qui sont des produits très utilisés dans le domaine de la photographie en tant que développeur mais aussi en cosmétique et qui souffrent tout particulièrement de la sensibilité à l'oxydation du fait de leur propriétés réductrices.

L'agent destiné à stabiliser l'agent actif sera choisi en fonction de la nature de cet agent actif et du type de dégradation que l'on cherche à éviter et, cela, en tenant compte en outre du type d'application visée.

Ainsi, le(s) additif(s) nécessaire(s) à la stabilisation peut (peuvent) être un (des) composé(s) spécifiquement conçu(s) pour apporter la protection de l'actif. C'est le cas où l'agent actif est un produit sensible à l'oxydation et l'agent destiné à éviter sa dégradation, un agent connu comme agent anti-oxydant.

C'est le cas également lorsque le produit actif voit sa stabilité modifiée par une variation de pH susceptible, par exemple, de provoquer une réaction d'hydrolyse ou encore de modifier le potentiel redox du produit actif. On choisira alors d'encapsuler un agent stabilisateur permettant de modifier localement le pH, de façon à accroître la stabilité du produit actif.

Lorsque l'on souhaite améliorer la stabilité d'un produit actif sensible à l'oxydation, la vésicule contient avantageusement un produit connu pour ses propriétés anti-oxydantes du fait de ses propriétés réductrices ou du fait de son action pour diminuer le risque d'oxydation par effet séquestrant, par exemple par effet séquestrant des traces d'ions métalliques catalyseurs de l'oxydation contenus dans le milieu, ou par action sur le pH du milieu lorsque le potentiel redox dépend du pH.

Ainsi, on citera de façon non exhaustive à titre d'agents anti-oxydants :

- l'acide ascorbique et ses dérivés,
- l'acide citrique et ses dérivés (aussi utilisés comme séquestrant),
- l'acide glutamique, les glutamates et leurs dérivés,
- 5 l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) (séquestrant),
- l'acide lactique et ses dérivés (aussi utilisés pour ajuster le pH),
- l'acide tartrique et ses dérivés (aussi utilisés pour ajuster le pH et comme agent séquestrant),
- la benzophénone,
- 10 les bioflavonoïdes,
- le butylhydroxy hydroxyanisol,
- le butylhydroxy hydroxytoluène,
- le carotène et ses dérivés,
- le chlorobutanol,
- 15 les gallates de propyle, d'octyle ou de dodécyle,
- le sulfite de sodium ou de potassium, et les composés apparentés tels que le bisulfite ou le pyrosulfite,
- les tocophérols (alpha, delta ou gamma) et leurs dérivés,
- d'une manière générale tous les additifs alimentaires des classes E3xx et E22x de
- 20 la classification européenne des additifs alimentaires.

A titre d'exemple, la vitamine C et ses dérivés sont bien connus pour leur sensibilité à l'oxydation. On a clairement mis en évidence qu'on pouvait améliorer leur stabilité en les co-encapsulant avec un agent anti-oxydant.

- 25 A titre d'agent anti-oxydant, on pourra utiliser du bisulfite de sodium et/ou un agent séquestrant et permettant d'éliminer les traces de métaux oxydants, par exemple l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA).

- 30 A titre d'exemple d'agent permettant d'éviter l'hydrolyse par effet de modification locale du pH, on citera le tartrate de sodium qui pourra être co-encapsulé avec de l'ascorbylphosphate de magnésium (APG) en vue d'augmenter sa stabilité par modification locale du pH.

- 35 L'agent destiné à stabiliser le produit actif peut également faire partie de la membrane de la vésicule, s'il a des propriétés amphiphiles. C'est le cas de la vitamine E ou de ses dérivés qui peuvent être co-encapsulés avec un actif sensible à l'oxydation, afin de jouer le rôle d'anti-oxydant donc protecteur. Mais la vitamine E (acétate de tocophérol) est un produit amphiphile de par sa nature moléculaire.

On pourra donc tirer avantage de cette propriété pour adapter la formulation de la phase cristal-liquide. Ainsi, la vitamine E est incorporée dans la membrane de tensioactif et joue un rôle actif dans la formulation de cette membrane permettant de conférer à la phase cristal-liquide les caractéristiques adéquates pour obtenir les vésicules par cisaillement.

Il existe également d'autres cas où l'agent stabilisant jouera également le rôle d'agent tensioactif participant à la formulation des membranes des vésicules. De tels exemples seront donnés plus loin à propos de la stabilisation des enzymes.

Selon une autre variante de l'invention, on pourra choisir comme agent destiné à stabiliser ledit agent actif un agent qui, en lui-même, constitue un second agent actif de la composition. C'est le cas par exemple de la vitamine E qui, du fait de ses propriétés anti-radicalaires, constitue dans une composition cosmétique où elle est associée avec de la vitamine A ou de la vitamine C, non seulement un agent destiné à stabiliser cette vitamine A comme indiqué précédemment, mais également un second agent actif de ladite composition.

Dans le cas particulier où la molécule à stabiliser est une enzyme, on recourra comme agent stabilisant d'une façon générale soit à un additif connu pour stabiliser ou protéger les protéines, désigné si après par additif protecteur non spécifique des enzymes, soit à un agent spécifique destiné à stabiliser spécifiquement une enzyme.

Ainsi, dans le cas des protéases, un inhibiteur de protéases permettra d'éviter l'autoprotéolyse.

Selon une première variante, où l'on utilise un additif protecteur non spécifique, celui-ci est choisi avantageusement parmi les produits qui sont connus pour agir sur la conformation de l'enzyme. A titre d'exemple de tels produits, on citera en particulier des ions dont l'effet est d'augmenter la force ionique et de se fixer sur certains sites chargés de l'enzyme ou des molécules susceptibles d'engager des liaisons faibles avec la protéine.

L'homme du métier comprendra aisément que les ions plus efficaces sont les ions relativement gros, par exemple des ions ammoniums et ammoniums quaternaires en ce qui concerne les cations et des sulfates, phosphates, carboxylates et polyacides carboxyliques en ce qui concerne les anions. L'homme du métier comprendra aisément que son choix pour obtenir la meilleure efficacité devra se porter sur des ions suffisamment gros ou attachés à une molécule

suffisamment grosse.

Parmi les ions particulièrement intéressants pour stabiliser les enzymes, on citera l'ion calcium bien connu pour intervenir spécifiquement dans la réactivité de beaucoup d'enzymes, en particulier des protéases.

5 Dans la variante selon laquelle on utilise des molécules spécifiques stabilisatrices, on choisit avantageusement des molécules portant des fonctions susceptibles de se lier à l'enzyme, par exemple des molécules qui ont la possibilité de former des liaisons hydrogènes avec l'enzyme. Parmi ces molécules, on citera en particulier les alcools et les polyols, avantageusement des polyols associés à un
10 dérivé du bore, en particulier à un ion borate, des amines éthoxylées et des oxydes d'amines. On pourra également choisir de recourir à des tensioactifs comportant plusieurs oxydes d'éthylène. De tels tensioactifs entreront dans la formulation des membranes des vésicules de l'invention et participeront à la stabilisation des enzymes.

15 Ainsi donc, on pourra citer à titre d'agents destinés à stabiliser des enzymes incorporées au sein de ces vésicules, des tensioactifs et des molécules amphiphiles contenant les fonctions suivantes ou substitués par les groupes suivants :

- ammoniums quaternaires,
- 20 • amines et éthanolamine,
- molécules portant une fonction phosphate, en particulier phospholipides,
- sels et esters d'acides gras,
- sels de polyacides,
- alcools,
- 25 • glycérol et ses esters (les glycérides),
- polyols (polyglycérides, polyéthylèneglycol, polypropylèneglycol),
- sucres (sorbitol, glucose, lactose, saccharose...),

Les agents stabilisants des enzymes seront avantageusement choisis parmi les dérivés polymères qui contiennent des fonctions d'un des types
30 précédents, en particulier :

◊ les polysaccharides modifiés ou non tels que :

- * agarose,
- * gommes guar,
- * carraghénanes,
- 35 * acide alginique et alginate,

* pectine,

* chitosan,

◇ les polyvinylpyrrolidones, éventuellement substituées,

◇ les celluloses et dérivés de celluloses (alkylés ou fonctionnalisés),

5 ◇ les polyacrylates,

◇ les polyvinylalcools (PVA) et les dérivés partiellement hydrolysés des polyvinylacétates,

◇ les polyacrylamides,

◇ les polyamides.

10 Les essais réalisés par les inventeurs de la présente invention montrent que la présence dans les vésicules multilamellaires incorporant une enzyme, en tant qu'agent destiné à éviter la dégradation de ladite enzyme, soit d'un tensioactif ou d'une molécule amphiphile présentant au moins une fonction azotée, soit d'un polymère présentant également une fonction azotée, permet d'améliorer
15 considérablement la stabilisation de l'enzyme.

Lorsqu'on recourt comme agent de stabilisation d'une enzyme à un agent tensioactif comportant au moins une fonction azotée, on choisit de préférence un agent tensioactif, dans lequel la fonction azotée fait partie de la tête polaire dudit agent tensioactif.

20 Selon cette variante où les fonctions azotées font partie de la tête polaire du tensioactif, la queue hydrophobe est avantageusement constituée d'une ou plusieurs chaînes carbonées. On peut donc définir indépendamment la nature de la partie hydrophobe qui ne varie pas beaucoup d'un tensioactif à l'autre : au moins une (deux en général) chaîne alkyle de 1 à 22 carbones, linéaire ou
25 ramifiée, simple ou substituée, éventuellement portant un résidu cyclique ou aromatique, saturée ou portant une ou plusieurs insaturations, éventuellement substituée par d'autres fonctions. La ou les chaînes formant la partie hydrophobe de l'agent tensioactif peuvent être soit directement liées à l'atome d'azote de la fonction azotée, soit, le cas échéant, liées à l'un des substituants de l'azote.

30 Lorsqu'on recourt, pour stabiliser une enzyme, à l'utilisation d'un polymère portant au moins une fonction azotée, on le choisit avantageusement dans la liste suivante :

- polyacrylamides et produits de polymérisation ou de copolymérisation des dérivés de l'acrylamide,

35 - dérivés amidés de polysaccharides en particulier gommages guar

quaternisées telles que le chlorure de guar hydroxypropyltrimonium.

- dérivés de la chitine tels que chitosan, sels de poly D-glucosamine, les contre-ions de ces polymères pouvant contenir une fonction amine ou dérivée (glutamate, par exemple),

5 - polyamides.

Dans le cas spécifique où l'on cherche à stabiliser une enzyme en évitant son autoprolyse, on co-encapsule avantageusement un inhibiteur de protéase, par exemple l'EDTA, le phénylméthanesulfonylfluorure, la 3,4-dichloroisocoumarine, la chymostatine.

10 Afin de renforcer le rôle de confinement joué par la vésicule, il peut être avantageux d'ajouter dans sa formulation un ou des polymères ou molécules à haut point de fusion, qui vont renforcer l'étanchéité de la vésicule. Ce renforcement de l'étanchéité peut aussi être obtenu par tout moyen permettant de diminuer l'échange avec le milieu de dispersion final, en particulier en enrobant la

15 vésicule avec un polymère ou une cire, éventuellement une cire autoémulsifiable. Ainsi, l'invention couvre également selon une variante avantageuse des compositions dans lesquelles les vésicules comprennent en outre au moins un agent destiné à renforcer leur étanchéité, cet agent étant encapsulé au sein des vésicules ou constituant un enrobage externe de ces mêmes vésicules.

20 Selon une variante particulièrement avantageuse de l'invention, on pourra choisir comme agent destiné à stabiliser le produit actif un agent qui simultanément améliore l'étanchéité de la vésicule. Ainsi, pour stabiliser la vitamine C, on la co-encapsulera avec de la pectine qui, en se liant à la vitamine C, la stabilise et qui simultanément améliore l'étanchéité de la vésicule.

25 En résumé l'invention consiste à utiliser la microvésicule multilamellaire comme un milieu de confinement d'une molécule fragile et des additifs permettant sa stabilisation, éventuellement en renforçant son étanchéité.

30 Selon un autre de ses aspects, l'invention couvre également le procédé de préparation d'une composition telle que définie précédemment comprenant les étapes de :

- préparation d'une phase lamellaire cristal-liquide comprenant au moins un agent tensioactif et incorporant au moins un agent actif et un agent destiné à éviter la dégradation dudit agent actif,

35 - transformation de ladite phase cristal-liquide en vésicules multilamellaires à structure en oignon, par cisaillement.

Ce cisaillement sera avantageusement un cisaillement homogène tel qu'enseigné dans le brevet FR 2 689 418.

La transformation de la phase lamellaire cristal-liquide en vésicules multilamellaires à structure en oignon pourra être facilitée en jouant sur le choix
5 tensioactifs. On pourra, en particulier, choisir comme indiqué précédemment un tensioactif présentant une haute HLB et un agent tensioactif présentant une basse HLB.

Par ailleurs, certains tensioactifs sont particulièrement adaptés pour favoriser cette transformation. Ainsi, c'est le cas par exemple des poloxamères, et
10 autres dérivés copolymères de l'oxyde d'éthylène et de l'oxyde de propylène éventuellement modifiés par adjonction de chaînes hydrophobes. Ces composés sont particulièrement intéressants car ils apportent à la fois l'adaptation des propriétés élastiques de la membrane de tensioactifs et sa stabilisation par effet stérique. On peut citer à titre d'exemples non exhaustifs la famille des Pluronic® et
15 Lutrol® (BASF), les hydroxystéarate de polyéthylène (Solutol® de BASF ou MYRJ® de ICI).

Enfin selon un dernier aspect, l'invention concerne également un procédé pour améliorer la stabilité d'un produit actif et éviter sa dégradation, caractérisé en ce qu'il consiste à encapsuler ledit produit actif au sein de vésicules
20 multilamellaires telles que définies précédemment, présentant une structure en oignon et constituées, de leur périphérie jusqu'à leur centre, de membranes sous forme de bicouches concentriques comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites membranes étant séparées par un liquide interstitiel, lesdites vésicules incorporant en leur sein au moins un agent destiné à éviter la dégradation dudit
25 produit actif.

Pour les raisons exposées précédemment l'invention trouve une application particulièrement intéressante dans la stabilisation et/ou l'immobilisation des enzymes.

Ainsi, l'invention porte tout particulièrement sur un procédé pour
30 protéger et/ou immobiliser une enzyme selon lequel on encapsule ladite enzyme au sein des vésicules multilamellaires à structure en oignon telles que définies précédemment, lesdites vésicules contenant en leur sein au moins un agent tel que défini précédemment destiné à éviter la dégradation de ladite enzyme.

Les excellents résultats obtenus en ce qui concerne la stabilisation
35 d'une l'enzyme, lorsque celle-ci se trouve incorporée au sein d'une vésicule

multilamellaire comprenant au moins un agent stabilisant choisi parmi les tensioactifs, les molécules amphiphiles et les polymères, portant au moins une fonction susceptible de se lier à ladite enzyme, ont semblé clairement liés à l'existence d'une liaison par laquelle l'enzyme se trouve en quelque sorte complexée à l'un des constituants des membranes de la vésicule. Ces résultats ont suggéré qu'une interaction du même type pourrait se produire entre la surface d'une vésicule multilamellaire incorporant dans ses membranes un tel agent stabilisant. Cette hypothèse a pu être confirmée par le fait qu'on a pu également constater un net effet de stabilisation d'une enzyme lorsque celle-ci se trouve mise en contact au sein d'une composition avec des vésicules multilamellaires à structure en oignon dont la formulation est telle que leurs membranes comprennent au moins un produit stabilisant choisi parmi les molécules amphiphiles, les tensioactifs et les polymères, portant au moins une fonction susceptible de se lier à ladite enzyme.

Ainsi donc, selon un autre aspect de la présente invention, elle concerne également un procédé pour protéger et/ou immobiliser une enzyme selon lequel on met ladite enzyme en présence de vésicules multilamellaires à structure en oignon, c'est-à-dire de vésicules constituées, de leur périphérie jusqu'à leur centre, de membranes sous forme de bicouches concentriques comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites membranes étant séparées par un liquide interstitiel, lesdites vésicules incorporant en leur sein au moins un composé dit agent stabilisant, portant au moins une fonction susceptible de se lier à ladite enzyme. Cet agent stabilisant est choisi parmi les molécules amphiphiles, les tensioactifs et les polymères cités précédemment comme agent ayant un effet stabilisant sur une enzyme encapsulée.

Les exemples qui suivent donnés à titre purement illustratif de l'invention montrent comment il a été possible selon l'invention d'améliorer la stabilité de différents actifs réputés fragiles.

Ces exemples font également référence aux figures 1 à 4 :

- la figure 1, donnée en référence à l'exemple 1, donne les variations de la concentration en vitamine C non dégradée en fonction du temps pour une composition où la vitamine C est encapsulée, en comparaison avec une composition où elle est libre ;

- la figure 2, donnée en référence à l'exemple 3, illustre la stabilisation de l'ascorbylphosphate de magnésium (APG) par co-encapsulation avec un agent modifiant son pH ;

5 - la figure 3, donnée en référence à l'exemple 5, illustre la stabilisation de la trypsine par encapsulation dans des vésicules multilamellaires à structure en oignon contenant, à titre d'agent stabilisant, un agent tensioactif portant une fonction ammonium ;

10 - la figure 4, donnée en référence à l'exemple 6, illustre la stabilisation de la trypsine par encapsulation dans une vésicule multilamellaire à structure en oignon incorporant un tensioactif de la famille des esterquats.

EXEMPLES

Dans les exemples qui suivent, sauf indications contraires, les proportions sont données en pourcentages en poids.

15

Exemple 1

Vitamine C

20 La vitamine C est très sensible à l'oxydation. La stabilisation a pu être obtenue par encapsulation dans des microvésicules multilamellaires, renforcées par un polymère naturel réticulé (pectine) et co-encapsulation d'additifs permettant la stabilisation : séquestrant éliminant les traces d'ions métalliques catalyseurs de l'oxydation (EDTA), anti-oxydant (bisulfite de sodium) en procédant comme indiqué ci-dessous :

25 a) Formulation :

Composants A	%
Polysorbate 60	24
oléate de sorbitan	20
Acétate de vitamine E	5
Conservateur	1

Composants B	%
Eau	37,5
Acide éthylène diamine tétra acétique	0,08
bisulfite de sodium	0,82
pectine	1,6
Acide ascorbique	10

b) Mode opératoire :

Les ingrédients B sont mélangés 30 min à température ambiante sous agitation dans l'ordre de la liste. On obtient un gel translucide.

- 5 Les ingrédients A sont mélangés à température ambiante sous agitation, puis le mélange B est ajouté en maintenant l'agitation et la température ambiante. L'agitation est maintenue 2 h.

On obtient une pâte épaisse, qu'il faut disperser à 50% dans une solution de chlorure de calcium, destinée à réticuler la pectine. Pour cela une
 10 solution aqueuse contenant 20 g/l de CaCl_2 est additionnée lentement à la pâte maintenue sous agitation. On obtient une dispersion fluide laiteuse, dont l'observation au microscope montre la présence de vésicules biréfringentes.

c) Dosage

- 15 La dispersion de vésicules est rediluée dans l'eau pour atteindre une teneur en vitamine C de 5%. Cette dispersion est placée en étuve à 45°C pour suivre la stabilité. La teneur en vitamine C dans l'échantillon est mesurée par un dosage à l'iode.

20 Le résultat de la stabilisation est illustré par la courbe de la figure 1 donnant le taux de vitamine C en fonction du temps à 45°C pour la dispersion de vésicules (notée "encapsulée" sur la figure 1) dont la préparation est décrite ci-dessus, en comparaison avec les résultats obtenus pour une simple dispersion de vitamine C à même concentration initiale dans l'eau (notée "libre" sur la figure).

- 25 On remarque que, alors que la solution de vitamine C se dégrade continuellement, la vitamine C encapsulée reste à 80% de sa quantité initiale pendant plus de 45 jours à 45°C.

Exemple 2Vitamine A et vitamine E

a) Formulation :

	Composant	%
A	Palmitate de saccharose	40
B	Linoléate de glycérol	9
C	Palmitate de Vitamine A	15
D	Acétate de vitamine E	1
E	Eau	34
F	Conservateur	1

5

b) Mode opératoire

B, C, D et F sont mélangés à température ambiante pendant 10 min. On additionne ensuite délicatement A en maintenant l'agitation. Lorsque A est complètement incorporé, on additionne E puis la température est augmentée à 65°C et maintenue pendant 1 h. La température est ensuite baissée à 40 °C en maintenant l'agitation, sur un intervalle de temps de 2 h.

10

On obtient une pâte homogène biréfringente montrant en observation au microscope une texture fine et régulière caractéristique.

15 c) Résultats

Le suivi par HPLC a clairement permis de mettre en évidence l'amélioration de la stabilité de la vitamine A du fait de son encapsulation dans des vésicules contenant, en outre, de la vitamine E.

20 Exemple 3Ascorbyl phosphate de magnésium (APG)

Ce composé est un dérivé de la vitamine C, plus stable que l'acide ascorbique, mais cependant peu stable en dessous de pH = 7,5. Cela pose un problème en cosmétique car le pH de la peau est de 5,5, et il est préférable que le produit cosmétique ait un pH voisin de celui de la peau.

25

Dans ce cas, l'encapsulation est effectuée dans des microvésicules de tensioactifs non-ioniques. L'APG est préalablement dissous dans un milieu tartrate de sodium, co-encapsulé dans les vésicules, apportant la stabilisation, en

procédant comme indiqué ci-dessous. La courbe de dégradation à 45°C, de l'APG libre et encapsulé, à pH= 5,5 est donnée sur la figure 2 qui donne le pourcentage d'APG non dégradé en fonction du temps.

5 a) Formulation :

Composant	%
Polysorbate 60	12
Stéarate de sorbitan	34
Acétate de tocophérol	4
Solution A	49
Conservateurs	1

Solution A :

	Acide tartrique :	2.88%
10	APG :	28%
	Eau :	69.12%

b) Mode opératoire :

15 La solution A est préparée préalablement par dissolution de l'acide tartrique dans l'eau, ajustement du pH à 7,3-7,5 par addition de soude 6N, et introduction lente sous agitation à température ambiante de l'APG en poudre.

20 Les tensioactifs, la vitamine E et le conservateur sont mélangés sous agitation à 70°C. Lorsque le mélange est fondu et homogène, la solution A est ajoutée lentement sous agitation à cette température. Lorsque l'incorporation est complète, le chauffage est arrêté, et la température abaissée jusqu'à l'ambiante, sous agitation, pendant 1 h.

c) Stabilité :

25 La stabilité du produit est suivie par dosage à l'iode de la vitamine C dans une dispersion aqueuse à 3% d'APG, soit libre, soit encapsulé dans les vésicules multilamellaires. Les résultats sont donnés sur la figure 2.

On constate que la dégradation de l'APG encapsulé est plus de 10 fois plus lente que celle de l'APG libre à ce pH (par la mesure du temps de demi dégradation).

Exemple 4Hydroquinone et ses dérivés

L'hydroquinone et ses dérivés sont couramment utilisés en photographie comme développateur, mais aussi en cosmétique comme agent éclaircissant de la peau. Ce sont des molécules fortement réductrices, qui s'oxydent donc facilement à l'air ou en milieu aqueux.

De la méthylhydroquinone a été encapsulée dans des vésicules de tensioactifs non ioniques encapsulant du bisulfite de sodium comme anti-oxydant.

10 a) Formulation

Vésicules

Composant	%
Polysorbate 60	10
Stéarate de sorbitan	40
Glycérol	34
Méthyl hydroquinone	16

Dispersion

Composant	%
Pâte de vésicules	50,0
Bisulfite de sodium	0,05
Conservateur	0,8
Eau permutée	49,15

15

b) Mode opératoire

Toutes les opérations (préparation, transfert et dispersion) sont effectuées sous atmosphère d'argon.

La méthyl-hydroquinone est préalablement dissoute dans le glycérol, à raison de 32 % de méthyl-hydroquinone pour 68 % de glycérol par mélange à 90°C pendant 30 min

Dans un émulsionneur muni d'une agitation mécanique avec une pale râcleuse, on mélange les deux tensioactifs et on chauffe à 70°C. Lorsque les tensioactifs sont fondus, on additionne la solution de méthyl-hydroquinone dans le glycérol et on maintient le mélange 30 min à cette température. Le chauffage est

25

ensuite arrêté pour laisser la température revenir à l'ambiante sous agitation. On obtient une pâte homogène blanche, dont l'observation en microscopie optique en lumière polarisée montre la texture biréfringente caractéristique de la présence de microvésicules.

- 5 La dispersion est effectuée par addition lente dans un erlenmeyer muni d'une pâle d'agitation mécanique de la solution de dispersion (eau dégazée et bisulfite de sodium) sur la pâte précédente, à température ambiante sous agitation continue. Le conservateur est additionné en une seule fois à la fin de l'addition de solution aqueuse. L'agitation est maintenue environ 2 h pour obtenir une
- 10 dispersion complète. L'observation au microscope optique montre une dispersion de vésicules légèrement biréfringentes.

c) Résultats

- Le produit encapsulé ne montre qu'une légère coloration rose alors
- 15 qu'une solution de méthylhydroquinone noircit rapidement.

Exemple 5

Stabilisation d'une enzyme par encapsulation dans une vésicule contenant un tensioactif portant une fonction ammonium

20

1) Principe du test de mise en évidence de la stabilisation des enzymes

- Pour démontrer l'effet de stabilisation des enzymes, on mesure l'activité d'une enzyme encapsulée, en fonction du temps de vieillissement, par comparaison avec l'enzyme simplement mise en solution dans les mêmes
- 25 conditions de vieillissement. L'enzyme encapsulée étant inaccessible, il faut préalablement la libérer pour pouvoir mesurer son activité. L'expérience comporte donc quatre étapes :

* préparation des échantillons

- 30 * encapsulation de l'enzyme et dispersion des vésicules contenant l'enzyme

* mise en solution à la même concentration de l'enzyme témoin

* mise en vieillissement de la dispersion de vésicules et de la solution témoin

- 35 * libération de l'enzyme des vésicules

* mesure de l'activité enzymatique de l'échantillon testé et de l'échantillon témoin.

L'activité enzymatique est évaluée par une méthode classique de suivi de la réaction de dégradation d'un substrat caractéristique de l'enzyme.

5 2) Conditions de l'essai

a) Enzyme

L'enzyme utilisée est la trypsine, c'est une sérine protéase (comme les protéases utilisées dans les détergents). Sa masse est de 23000 g/mol et sa taille est comprise entre 20 et 40 Å.

10 Conditionnée sous forme lyophilisée, on la solubilise dans du tampon sous forme d'une solution à 4% en masse. C'est cette solution à 4% qui est utilisée dans les préparations.

Pour les mesures, les échantillons témoins sont préparés en prenant 50µl (50 mg) de cette solution pour 5 g de solution finale soit une teneur en 15 enzyme dans la solution finale de 0.04% en masse.

b) Vésicules

La teneur massique en enzyme dans les vésicules est de 0.15%. Sauf indication contraire, les vésicules sont préparées par mélange à température 20 ambiante des tensioactifs puis incorporation de la solution aqueuse d'enzyme. On obtient ainsi une pâte visqueuse, de texture biréfringente caractéristique (observation au microscope optique en lumière polarisée). Cette pâte est dispersée par addition lente d'eau sous agitation à température ambiante.

Pour les mesures d'activité, toutes les dispersions de vésicules ont une 25 teneur de 2% en vésicules. La teneur en enzyme de la dispersion de vésicules est donc de 0,04%.

c) Tampon

C'est un tampon phosphate de composition :

30 NaCl : 8 g/l
KCl : 0.2g/l
Na₂HPO₄ : 1.15 g/l
KH₂PO₄ : 0.2 g/l

Le pH est compris entre 7.5 et 8 .

d) Substrat

On utilise comme substrat le N-Benzoyl L arginyl ethyl ester (BAEE) qui est un substrat classiquement utilisé pour étudier l'activité de la trypsine dans la mesure où l'on sait que sa décomposition est catalysée par la trypsine. Le produit de réaction absorbe dans l'UV.

e) Mesure d'activité

Elle est réalisée de la façon suivante :

10 e1. *Destruction des vésicules :*

On prélève 25µl d'échantillon et on ajoute 20 µl de solution de triton X100 (Sigma) à 10%. On laisse agir environ 30 secondes.

e2. *Mesure de l'activité enzymatique :*

15 On prélève 37µl de solution de substrat à 0,024 mol/l, on ajoute 950 µl de tampon et 22,5 µl d'échantillon. On suit la cinétique pendant 10 minutes à une longueur d'onde de 253 nm et à 20°C.

Le vieillissement des échantillons est effectué en étuve, à la température de 37°C.

20

3) Formulation testée

Agents tensioactifs utilisés :

25 Polysorbate 60 : Polyoxyéthylène (20) sorbitan monostéarate.
DODMAB : bromure de diméthyl dioctadécyl ammonium.

Formulation :

- 15% solution aqueuse d'enzyme.
- 30 • 35% eau
- 25% DODMAB.
- 25% Polysorbate 60.

Préparation :

35 Les tensioactifs et la solution d'enzyme sont mélangés grossièrement à

température ambiante, puis le mélange est introduit dans une cellule de type Couette en procédant selon le brevet WO93/19735.

Le cisaillement est réalisé à 25 °C pendant 20 minutes, à un taux compris entre 50 et 100 s⁻¹.

5

4) Résultats

La dégradation de l'enzyme est suivie par spectroscopie UV.

La figure 3 représente les variations de l'activité enzymatique au cours du temps pour l'enzyme encapsulée, en comparaison avec les variations observées pour l'enzyme libre. L'activité initiale est fixée arbitrairement à 100 pour le tracé de la courbe.

10

La figure 3 met clairement en évidence la stabilisation de l'enzyme du fait de son encapsulation.

15 Exemple 6 : Stabilisation d'une enzyme par encapsulation dans une vésicule contenant un esterquat

On procède comme dans l'exemple 5. Le tensioactif utilisé dans cet exemple fait partie de la famille des esterquat. Il s'agit du : N,N di(" acyl " oxy-2-éthyl), N-hydroxy-2-éthyl, N-méthyl amonium methosulfate en solution dans l'isopropanol commercialisé par CECA sous la marque Noxamium 920.

20

Formulation (en pourcentages en poids)

	solution aqueuse d'enzyme	15%
25	eau	35%
	Noxamium 920	50%

Préparation

La préparation des vésicules est analogue à celle de l'exemple 5.

30

La figure 4 représente les variations de l'activité enzymatique au cours du temps pour l'enzyme encapsulée en comparaison avec les variations observées pour l'enzyme libre. L'activité initiale est arbitrairement fixé à 100.

Cette figure met clairement en évidence la stabilisation de l'enzyme du fait de son encapsulation.

35

REVENDICATIONS

1. Composition contenant un agent actif encapsulé au sein de vésicules multilamellaires présentant une structure en oignon et constituées, de leur
5 périphérie jusqu'à leur centre, de membranes concentriques sous forme de bicouches comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites membranes étant séparées par un liquide interstitiel, caractérisée en ce que lesdites vésicules contiennent au moins un agent destiné à éviter la dégradation dudit agent actif.
2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que le
10 liquide interstitiel est de l'eau et en ce que l'agent actif est inclu dans les membranes desdites vésicules lorsqu'il est hydrophobe ou dans le liquide interstitiel lorsqu'il est hydrophile.
3. Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que lesdites vésicules ont des dimensions comprises entre 0,1 et 50 μm , de
15 préférence entre 0,2 et 10 μm .
4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les membranes desdites vésicules comprennent un mélange de deux agents tensioactifs dits respectivement agent tensioactif lipophile, présentant une balance hydrophile-lipophile (HLB comprise entre 3 et 7), et agent tensioactif hydrophile,
20 présentant une HLB comprise entre 8 et 15.
5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les membranes des vésicules contiennent au moins un agent tensioactif polymère ou un polymère présentant des propriétés amphiphiles.
6. Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce
25 que ledit agent actif est choisi dans le groupe constitué des molécules réductrices, oxydantes, sensibles à l'hydrolyse, en particulier, les vitamines, les enzymes et les protéines.
7. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce
30 que ledit agent actif est un produit sensible à l'oxydation et ledit agent destiné à éviter sa dégradation, un produit connu pour ses propriétés anti-oxydantes du fait de ses propriétés réductrices ou du fait de son action pour diminuer le risque d'oxydation par effet séquestrant, par exemple par effet séquestrant des traces d'ions métalliques catalyseurs de l'oxydation contenus dans le milieu, ou par action sur le pH du milieu lorsque le potentiel redox dépend du pH.

8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que lesdites vésicules contiennent de la vitamine C ou un de ses dérivés à titre d'agent actif et au moins un agent destiné à éviter son oxydation.

5 9. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle contient au moins une enzyme à titre d'agent actif dont on cherche à éviter la dégradation.

10 10. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit agent destiné à éviter la dégradation de ladite enzyme est un agent stabilisant connu pour stabiliser les protéines, de préférence un agent agissant sur la conformation de l'enzyme, en particulier un ion, par exemple un ion calcium, ou un agent portant des fonctions susceptibles de se lier à ladite enzyme.

15 11. Composition selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisée en ce que ledit d'agent destiné à stabiliser ladite enzyme est choisi parmi les agents tensioactifs et les molécules amphiphiles contenant les fonctions suivantes ou substitués par les groupes suivants :

- ammoniums quaternaires,
- amines et éthanolamine,
- molécules portant une fonction phosphate, en particulier phospholipides,
- sels et esters d'acides gras,
- 20 • sels de polyacides,
- alcools,
- glycérol et ses esters (les glycérides),
- polyols, tels que polyglycérides, polyéthylèneglycol, polypropylèneglycol,
- sucres tels que sorbitol, glucose, lactose, saccharose.

25 12. Composition selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisée en ce que ledit agent destiné à stabiliser ladite enzyme est un polymère, choisi dans le groupe constitué :

- des polysaccharides modifiés ou non, tel que l'agarose, les gommes guar, les carraghénanes, l'acide alginique et les alginates, la pectine, le chitosan,
- 30 - des polyvinylpyrrolidones éventuellement substituées,
- de la cellulose et des dérivés de cellulose tel que les dérivés alkylés ou fonctionnalisés,
- des polyacrylates,
- des polyvinylalcool (PVA) et des dérivés partiellement hydrolysés des
- 35 polyvinylacétates,

- des polyacrylamides,
- des polyamides.

13. Composition selon l'une des revendications 9 à 12, caractérisée en ce que ledit agent destiné à éviter la dégradation de ladite enzyme est un composant comportant au moins une fonction azotée, en particulier un agent tensioactif ou un polymère.

14. Composition selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que ledit agent destiné à éviter la dégradation dudit agent actif présente un caractère amphiphile lui conférant un rôle actif dans la formulation des membranes desdites vésicules.

15. Composition selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que ledit agent destiné à stabiliser ledit agent actif constitue un second agent actif.

16. Composition selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisée en ce que lesdites vésicules comprennent en outre au moins un agent destiné à renforcer leur étanchéité, ledit agent étant encapsulé au sein desdites vésicules ou constituant un enrobage externe desdites vésicules.

17. Procédé de préparation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- préparation d'une phase lamellaire cristal-liquide comprenant au moins un agent tensioactif et incorporant au moins un agent actif et un agent destiné à éviter la dégradation dudit agent actif,
- transformation de ladite phase cristal-liquide en vésicules multilamellaires à structure en oignon, par cisaillement.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que ledit cisaillement est un cisaillement homogène.

19. Procédé pour améliorer la stabilité d'un produit actif et éviter sa dégradation, caractérisé en ce qu'il consiste à encapsuler ledit produit actif au sein de vésicules multilamellaires telles que définies dans l'une des revendications 1 à 16 ou obtenues selon le procédé de l'une des revendications 17 ou 18, présentant une structure en oignon et constituées, de leur périphérie jusqu'à leur centre, de membranes sous forme de bicouches concentriques comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites membranes étant séparées par un liquide interstitiel, lesdites vésicules incorporant en leur sein au moins un agent destiné à éviter la dégradation dudit produit actif.

20. Procédé pour protéger et/ou immobiliser une enzyme caractérisé en ce qu'il consiste à mettre ladite enzyme en présence de vésicules multilamellaires à structure en oignon incorporant en leur sein au moins un agent destiné à éviter la dégradation de ladite enzyme tel que défini dans l'une des revendications 11 à 13 ou à encapsuler ladite enzyme au sein de vésicules multilamellaires telles que définies dans l'une des revendications 9 à 13 ou obtenues selon le procédé de l'une des revendications 17 ou 18, lesdites vésicules incorporant en leur sein au moins un agent destiné à éviter la dégradation de ladite enzyme tel que défini dans l'une des revendications 10 à 13.

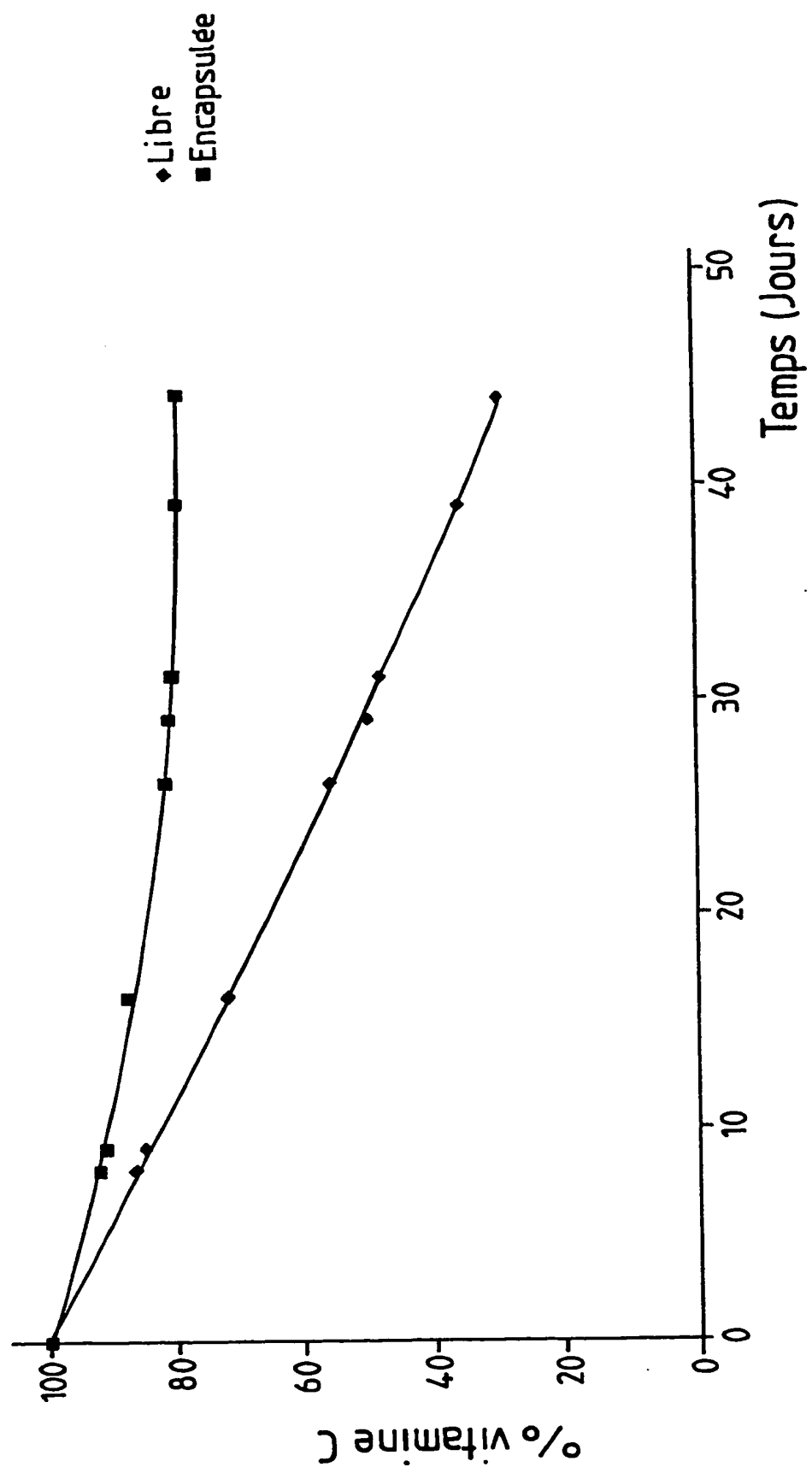


FIG.1

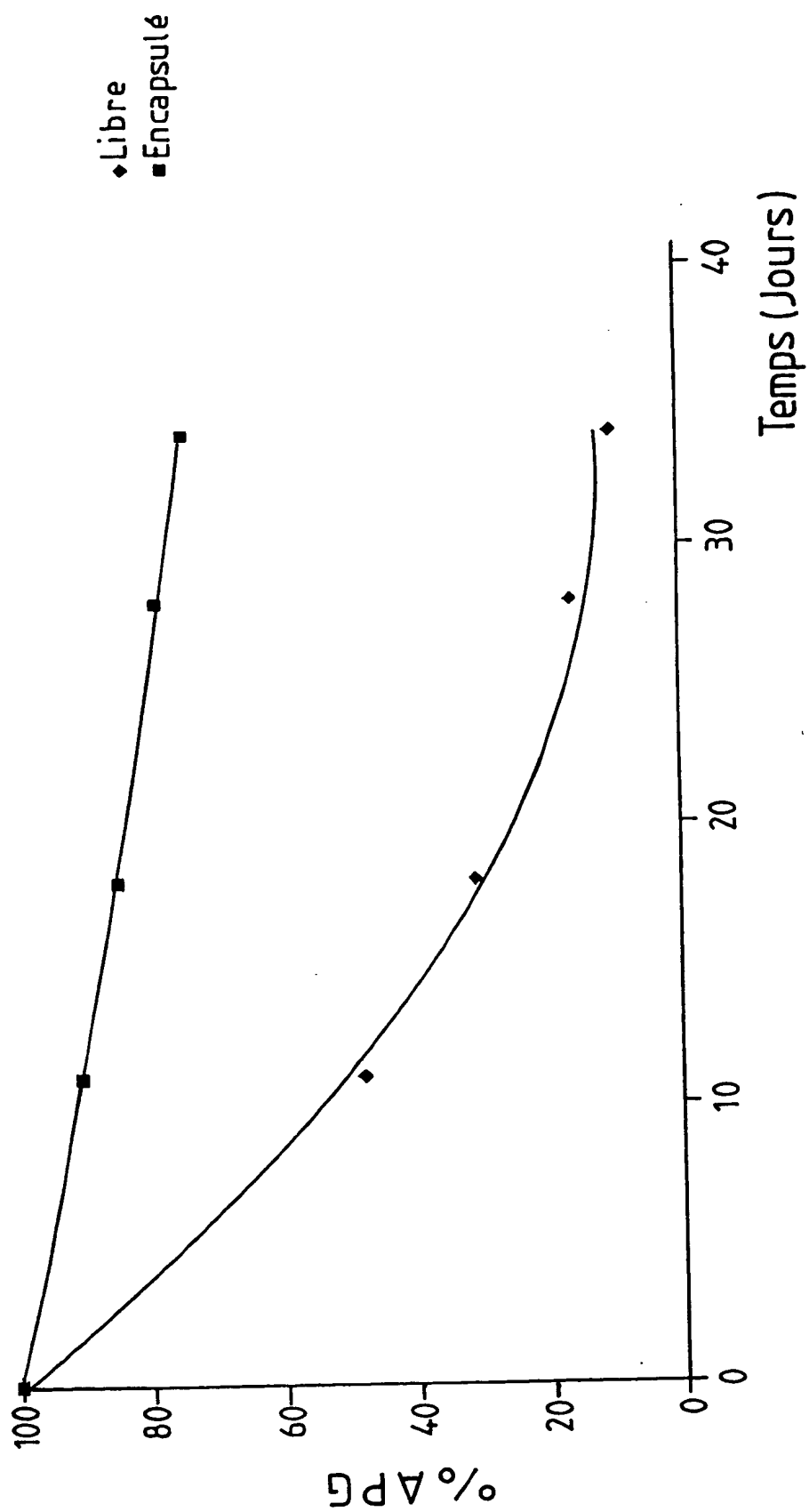


FIG.2

3/3

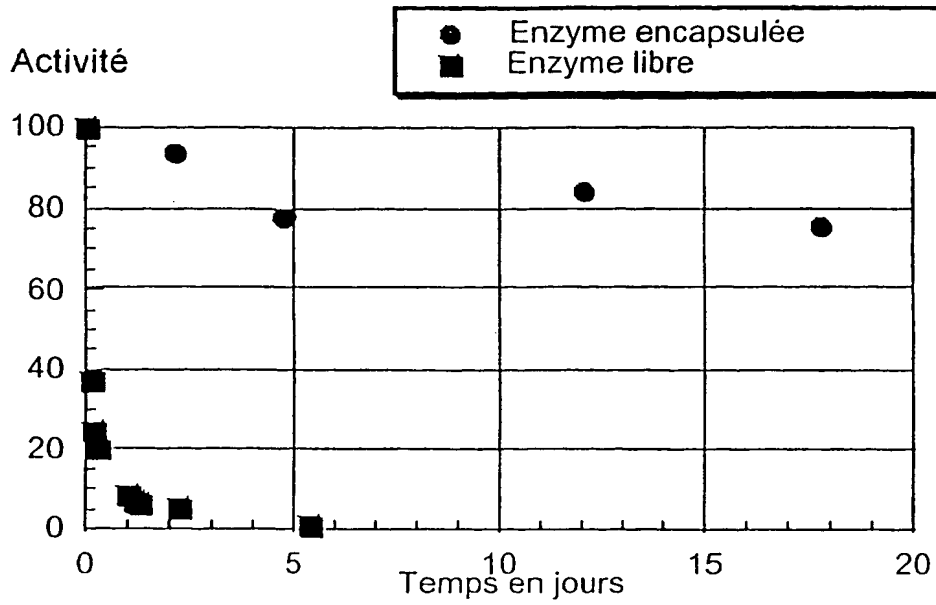


FIG. 3

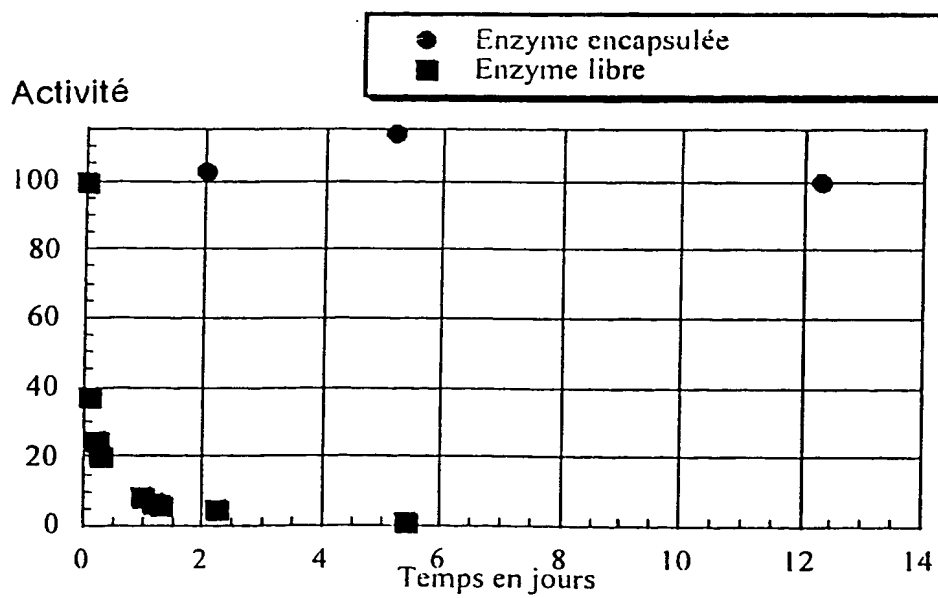


FIG. 4